

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСЛЕДЕЙСТВИЯ X-ЛУЧЕЙ НА МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

К. В. Ватти

Вопрос о наличии или отсутствии последствий радиации представляет интерес для понимания природы действия ионизирующих излучений на клетку. Еще до недавнего времени не допускалось и мысли о том, что возникновение мутаций может быть процессом, текущим во времени. Однако в последние годы это положение приобретает новый смысл.

Так, в 1947 г. Лобашевым была предложена физиологическая (параксенологическая) типология мутационного процесса, согласно которой образование мутации происходит не в фазе повреждения клетки, а в фазе восстановления — процессе истощающейся репарации субстанциональных изменений» (Лобашев, 1947, стр. 25). Влияя тем или иным путем на фазу восстановления, можно или ускорить процесс возвращения клетки в исходное состояние, или, наоборот, углубить процесс повреждения. Позднее Мак-Элрой и Свенсон (Mc. Elroy a. Swanson, 1951) высказали близкую к указанной гипотезу, согласно которой ген на пути от исходного к мутантному состоянию находится в активированном полустабильном состоянии, из которого его может вывести какой-либо даже слабо действующий фактор.

По гипотезе Корогодина и Лучника (1960), в клетке под влиянием облучения также возникают обратимые первичные изменения, которые в зависимости от сопутствующих условий могут либо восстановиться, либо реализоваться в необратимые повреждения.

Согласно представлениям Свенсона, в результате облучения в хромосомах возникают разрывы двух типов: потенциальные, или латентные, и первичные. Первичные, т. е. реально существующие разрывы при расхождении концов хромосом могут превращаться в нехватки, а также воссоединяться или рекомбинироваться, в результате чего будет восстанавливаться исходное состояние или образуются транслокации. Латентные разрывы или не реализовываются, в результате чего целостность хромосомы не нарушается, или реализуются в истинные. Нам представляется, что латентные разрывы следует рассматривать как активированное полустабильное состояние, которое может переходить в исходное или новое состояние равновесия, т. е. в истинный разрыв.

Таким образом, согласно приведенным гипотезам, любой фактор, вызывающий мутации, в том числе и ионизирующее излучение, должен иметь последствие, выражающееся в появлении в облученной клетке неустойчивого обратимого состояния, проявляющегося в повышенной чувствительности.

О поведении хромосом после облучения можно судить двояко: путем непосредственных цитологических наблюдений и косвенным путем, учитывая частоту возникновения мутаций. Одним из возможных путей выявления последствий ионизирующей радиации является предложенная Лобашевым и Павловцем (1937) методика дополнительных, относительно слабых воздействий после облучения, например повышенной или пониженной температурой. Лобашев и Павловец подвергали самцов дрозофилы после облучения длительному воздействию (до 24 суток) пониженной температурой ($+15^{\circ}$) и получили резкое увеличение частоты мутаций и транслокаций.

Аналогичная методика применялась рядом авторов в цитогенетических и генетических исследованиях. Так, Сакс и Энцман (Sax a. Enzmann, 1939) через 2 мин после облучения микроспор традесканции помещали их на 1,5 ч в разные температурные условия и показали, что число хромосомных aberrаций, регистрируемых цитологически, возрастает в низкой и снижается в высокой температурах. В работе Сакса (Sax, 1947) на том же объекте повышенная температура, примененная в течение нескольких минут после облучения, не дала изменения количества aberrаций.

Колдекотт и Лэзер (Caldecott a. Luther, 1951) показали, что помещение облученных x -лучами семян ячменя в высокую температуру приводит к снижению частоты хромосомных aberrаций в клетках кончика корня и к увеличению частоты мутаций в проростках F_2 . Эренберг (Ehrenberg, 1955) и Эренберг и Лэнквист (Ehrenberg a. Lunquist, 1957) на том же объекте также вызывали изменение количества мутаций при воздействии на облученные семена высокими и низкими температурами. Курбаяши (Karabayashi, 1953), помещая облученную молодую ткань *Paris tetraphylla* в пониженную температуру, получал повышение частоты хромосомных aberrаций. Однако, в большинстве перечисленных работ не исследовалась продолжительность состояния последствий, так как температурные воздействия производились или в течение длительного срока, или если кратковременно, то только сразу после облучения.

Представляется интересным выяснить, в течение какого времени после облучения x -лучами в клетке сохраняется состояние повышенной чувствительности к дополнительным кратковременным воздействиям нечувствительными агентами. С этой целью нами проводились температурные воздействия в разные сроки после облучения. Объектом исследования служила дрозофила. Изучалась частота сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций по методу CIB и морфозов (вырезка на крыле).

В первой серии опытов 4—5-дневные личинки линии Кантон-С облучались x -лучами при следующих условиях: доза 1500 р, мощность 273 р/мин, напряжение 178 кв, сила тока 10 ма, фокусное расстояние 23 см, без фильтра. Через 1, 3 и 6 ч после облучения личинки помещались на 8 ч в высокую температуру $+37^{\circ}$. Частота спонтанного мутационного процесса в линии Кантон-С составляет 0,05%. Из табл. 1 видно, что температура 37° в наших условиях эксперимента не является сильно действующим фактором, так как число мутаций, вызванных ею, составляет лишь 0,11%. Облучение дозой 1500 р дает 1,81% мутаций.

Чего же можно ожидать при дополнительном температурном воздействии в разные интервалы после ионизации?

Если x -лучи не дают эффекта последствий, т. е. изменения, происходящие в клетке, начинаются и заканчиваются одновременно при облучении, приводя к образованию мутации, а по окончании облучения хромосомы находятся в стабильном неизменном или тоже стабильном мутантном состоянии, то количество мутаций при дополнительном дей-

ствии температуры должно примерно равняться сумме мутаций, получаемых при действии x -лучей и температуры порознь.

Если же клетка и ее ядерный материал после облучения находятся в состоянии повышенной чувствительности, то дополнительное даже слабое воздействие после облучения окажется сильно действующим агентом. В таком случае число мутаций будет превышать сумму, полученную при действии x -лучей и температуры порознь. Таким образом, повышенная температура служит индикатором наличия или отсутствия незакончившихся мутационных изменений, или последствия.

Таблица 1

Частота летальных мутаций у дрозофилы при действии температуры через разные сроки после облучения личинок

Характер воздействия	Число культур T_0	Наших летальных	
		число	%
Без воздействия	2014	2	0,10 ± 0,06
Температура 37° в течение 8 ч	388	4	0,11 ± 0,05
Облучение 4000 r	382	54	1,41 ± 0,14
Облучение 4000 r + температура 37° в течение 8 ч	1807	69	3,82 ± 0,47
То же через 3 ч	112	8	7,14 ± 2,19
То же через 6 ч	2660	27	1,01 ± 0,250

Как показывает табл. 1, при действии температуры через 4 ч после облучения количество мутаций превышает их сумму в температурном и облученном контролях (3,82% при дополнительном воздействии и 0,11 + 1,41% = 1,52% = 0,250% — сумма двух контролей; $t = 3,8$). Это дает основание говорить о наличии в клетке состояния повышенной чувствительности, созданной предшествующим облучением. При действии температуры через 3 и 6 ч после облучения количество мутаций от суммы двух контролей достоверно не отличается, т. е. последствием в том смысле, как мы его понимаем, уже нет, клетка возвращается в исходное равновесное состояние.

Итак, в незрелых половых клетках 4—5-дневных личинок дрозофилы в течение 1 ч после облучения выявляется состояние последствия, проявляющееся в повышенной чувствительности к высокой температуре.

Во второй серии опытов облучению подвергались имаго в возрасте 2—4 дней дозой 3000 r при тех же условиях облучения. Температурное воздействие (37° в течение 8 ч) применялось через 10 мин, 1, 24 и 48 ч после облучения. Ввиду того, что число мутаций в половых клетках по мере отдаления от момента облучения изменяется вследствие дифференциальной чувствительности половых элементов, а также из-за идущих процессов восстановления исходного состояния, мы ставили к каждой опытной группе соответствующий рентгеновский контроль (спаривание контрольных мух в момент спаривания в опытной группе). Как видно из табл. 2, ни один из сроков дополнительного температурного воздействия не дал увеличения частоты мутаций по сравнению с суммой температурного и рентгеновского контролей.

Таким образом, явление последствия на имаго не установлено. Очевидно, это связано с тем, что на повреждения, возникающие в хромосомах после облучения, можно влиять в том случае если клетка находится в состоянии деления. Это имеет место на личиночной стадии,

где половые клетки представлены сперматогониями. В случае имаго облучению подвергаются сперматозонды, т. е. неделящиеся клетки.

Как уже говорилось, регистрируемые генетическим методом рецессивные летальные мутации являются преимущественно результатом локализованных хромосомных повреждений—разрывов. Поэтому мы можем судить о наличии состояния последствия в первую очередь в отношении самих хромосом, а не всей клетки в целом.

Таблица 2

Частота летальных мутаций у дрозофилы при действии температуры в разные сроки после облучения имаго

Характер воздействия	Число культур F_2	Из них летальных	
		число	%
Температура 37°	1557	2	0,13 ± 0,091
Облучение 3000 p	1182	71	6,01 ± 0,691
То же + 37° через 10 мин	793	42	5,83 ± 0,883
Облучение 3000 p	927	62	6,68 ± 0,820
То же + 37° через 1 ч	1012	66	6,52 ± 0,776
Облучение 3000 p	560	42	7,50 ± 1,113
То же + 37° через 24 ч	603	46	7,62 ± 1,080
Облучение 3000 p	351	19	5,41 ± 1,207
То же + 37° через 48 ч	419	23	5,12 ± 1,038

Представляет интерес выяснить, существует ли последствие и для процессов, идущих на общеклеточном и тканевом уровне. С этой целью одновременно с мутациями мы изучали возникновение рентгеноморфозов, т. е. ненаследственных изменений каких-либо морфологических признаков у организма, облученного на эмбриональной стадии.

Намн учитывался морфоз—вырезка на крыле,—обусловленный цитоллизом тканей крыла, начавшего развиваться нормально. Его возникновение возможно в том случае, если облучение производится в момент, когда клетка имагинального диска находится в так называемом чувствительном периоде. Именно в этот момент имеется наибольшая возможность нарушить нормальный ход процесса развития крыла.

Если бы соматическим клеткам не было присуще последствие, то при дополнительном температурном воздействии можно было бы ожидать лишь изменения в уже ненормально развивающемся вследствие облучения крыле, т. е. изменения размеров вырезки, но не должно быть увеличения или уменьшения количества особей с морфозом. Если же последствие имеет место в соматических клетках, то при дополнительном температурном воздействии на облученные личинки мы должны получить изменение частоты морфозов.

В опытах Лобашева и Солодовникова (1939) облучение личинок перед окукливанием и последующее содержание их до имаго в пониженных температурах привело к резкому увеличению количества морфозов. В наших опытах (табл. 3) высокая температура сама по себе не вызывала появления морфозов. Применяя ее через 1 и 3 ч после облучения, удалось резко повысить частоту их появления: с 5,5% до 8,7% и 15,4% соответственно ($t = 3,8$ и $2,9$).

Количество рентгеноморфозов у дрозофилы при действии температуры через разные сроки после облучения личинок

Характер воздействия	Число мух	Из них с морфозами	
		число	%
Температура 37°	849	—	—
Облучение 1500 p	2493	124	5,5 ± 0,47
Облучение 1500 p + 37° через 1 ч	1720	150	8,7 ± 0,68
То же через 3 ч	110	17	15,4 ± 3,44
То же через 6 ч	521	23	4,4 ± 0,89

Итак, приведенные данные свидетельствуют о том, что путем дополнительных температурных воздействий можно изменять генетический и биологический эффект облучения. Иными словами, в половой и соматической клетке после облучения возникает обратимое состояние повышенной чувствительности (последствие). Благодаря наличию такого обратимого чувствительного состояния дополнительное воздействие может усиливать процесс повреждения, препятствовать репарации и приводить к образованию мутации, морфоза и т. п.

Почему же в опытах разных авторов повышенная температура и ослабляет эффект облучения, и усиливает его, а в некоторых случаях никак на него не влияет? Очевидно, нельзя говорить просто о высокой и просто о низкой температурах, необходимо проводить градации в пределах этих понятий.

Действие повышенной температуры в пределах обратимости реакций, идущих в клетке после ионизации, может способствовать ускорению воссоединения разрывов хромосом, препятствовать превращению латентных разрывов в истинные (Сакс и Энциманн, Эренберг, Курбаяши) и уменьшать, таким образом, количество мутаций и аберраций. Высокая температура, выходящая за норму обратимости — репарации, может являться провоцирующим агентом, она будет усиливать процесс повреждения, превращать латентные разрывы в истинные и увеличивать, таким образом, число мутаций (Лобашев и Павловец, 1937; наши данные).

Низкая температура замедляет воссоединение разрывов, препятствует возвращению клетки в исходное состояние, увеличивает число мутаций (Эренберг). Однако она может приводить и к повышенной гибели половых клеток, несущих мутации. Отсюда — понижение частоты мутаций. Так, в опытах Лобашева и Павловец дополнительное воздействие температурой 15° на имаго дает увеличение количества мутаций, для личинок — понижение.

Одним из важных условий, определяющих характер реакции облученной клетки на дополнительные воздействия, является стадия ее деления. Наиболее чувствительной к таким воздействиям будет делящаяся клетка, так как именно в этот момент клеточного цикла возможно осуществление различного рода хромосомных перестроек, превращение латентных разрывов в истинные. Это подтверждается нашими опытами, в которых явление последствия установлено для незрелых делящихся клеток (сперматогонии личинок) и не найдено для зрелых (сперматозонды имаго).

Характер влияния температуры зависит, кроме того, от многих других причин. Так, имеет значение продолжительность температурного воздействия. Кратковременное воздействие не изменит характер после-

действия и не выявит его (Sax, 1947), а достаточно продолжительное может служить индикатором последдействия (Sax и Epizmann, 1939). Но в то же время очень сильное и продолжительное влияние температуры может снизить процент мутаций за счет усиления зачаткового отбора.

Эффективность дополнительных воздействий зависит и от того, какова реакция клетки на облучение во времени. Так, у традесканции разрывы закрываются в течение 20—60 мин после облучения, у дрозофилы они могут оставаться открытыми до момента оплодотворения. Следовательно, у традесканции есть больше шансов повлиять на ход последдействия только в первый час после облучения, у дрозофилы — в более длительные сроки.

Далее, имеет значение и тот факт, что повреждение клетки, развиваясь во времени, максимально проявляется не сразу после облучения, а спустя определенный промежуток времени. Так, в опытах Курбаяши максимальное число хромосомных aberrаций наблюдалось через 96 ч после облучения при 0° и через 8 ч при +20°.

Очевидно, любой фактор, а не только ионизирующее излучение, имеет последдействие. Это доказано для ультрафиолетовых лучей, химических агентов и т. п. Таким образом, наличие последдействия и растянутость мутационного процесса во времени — общее явление.

ВЫВОДЫ

1. Дополнительное температурное воздействие (+37°) через 1 ч после облучения личинок (половые клетки на стадии сперматогониев) увеличивает частоту детальных мутаций по сравнению с суммой изменений, возникающих при действии температуры и x-лучей порознь (температурный контроль 0,11%, рентгеновский контроль — 1,81%, с дополнительным температурным воздействием — 3,82%).

2. Дополнительное воздействие повышенной температурой на облученные имаго (половые клетки на стадии сперматозондов) не приводит к увеличению частоты мутаций.

3. Повышенная температура не вызывает появления морфозов, но примененная в разные сроки после облучения резко увеличивает их количество (с 5,5% до 8,7% через 1 ч после облучения, до 15,4% через 3 ч после облучения).

4. Полученные факты позволяют считать, что в незрелых половых и соматических клетках после облучения возникает обратимое состояние повышенной чувствительности (последдействие), на фоне которого дополнительное слабое воздействие приводит к увеличению количества мутаций и морфозов, достоверно превышающих сумму изменений, возникающих при действии этих агентов порознь.

STUDIES OF THE AFTER-EFFECT OF X-RAYS ON THE MUTATION PROCESS

K. V. Vatti

The article comprises the experimental data on the combined effect of the x-ray irradiation and of the subsequent temperature treatment on the frequency of mutations and modifications in *Drosophila melanogaster*.

It has been shown that the exposure to high temperature for one hour after the irradiation with x-rays results in a considerable increase of the mutation rate by far exceeding the sum of the effects of separate x-ray and temperature treatments. The frequency of modifications was also increased



by the temperature treatment of larvae for 1—3 hours following the irradiation and this increase likewise exceeded the sum of the separate effects of x-rays and temperature.

The problem is discussed of the reversible state of high sensitivity induced by x-rays (called by the author the after-effect of x-rays) in the immature germ- and somatic cells, during which even relatively slight subsequent action of certain environmental factors amplifies considerably both the genetic and the biological effect of irradiation.

ЛИТЕРАТУРА

- Корогодни В. П., Н. В. Лучник. 1960. «Биофизика», V, 1: 88—90.
Лобашев М. Е., М. Т. Павловец. 1937. Биол. ж., VI, 3: 689—696.
Лобашев М. Е., В. Б. Солодовников. 1939. Докл. АН СССР, XXIII, 8: 822—825.
Лобашев М. Е. 1947. Вестник ЛГУ, 8: 10—29.
Caldecott R. S., S. Luther. 1951. Genetics, 36, 5: 546.
Ehrenberg L. 1955. Hereditas, 41, 1: 123—146.
Ehrenberg L., U. Ljunquist. 1957. Hereditas, 43, 2: 390—402.
Karabayashi M. 1953. Cytologia, 18, 3: 253—265.
Mc Elroy W. D., C. P. Swanson. 1951. Quart. rev. biol., 26: 318—363.
Sax K. E., V. Enzmann. 1939. Proc. Nat. Acad. sci., 25, 8: 397—405.
Sax K. 1947. Genetics, 32, 1: 75—78.